Universidad Nacional
Federico Villarreal

PRÁCTICA 6: EL PODER BACTERICIDA DEL SUERO

Estudiantes:

-Zabarburú Fernández, Roa (Ronaldo)
-Sairitupa Miranda, Carla Vanessa

Docentes:
Rivas Cardenas, Arturo
Hernandez Acasiete Mirtha
Suárez Obregón Evert

Asignatura:

Inmunología I

Lima - Perú

2025 - I

INTRODUCCIÓN

El suero sanguíneo posee propiedades bactericidas gracias a la presencia del sistema del complemento, un conjunto de proteínas plasmáticas que actúan de manera coordinada para eliminar microorganismos patógenos. Estas proteínas se activan en cascada y pueden provocar la lisis directa de bacterias o facilitar su eliminación por fagocitosis. En esta práctica se evaluó el poder bactericida del suero frente a *Escherichia coli* (E. coli), mediante la preparación de una emulsión bacteriana que se mezcló con suero y se diluyó posteriormente en solución salina a concentraciones de 1/100, 1/1000 y 1/10000.

Se realizaron dos experimentos: en uno se utilizó suero sin calentar, que conserva la actividad del sistema del complemento, y en el otro, suero previamente calentado a 56 °C durante 30 minutos para desactivar dicho sistema. El objetivo fue comparar el crecimiento bacteriano en ambos casos, y evidenciar la acción del sistema de complemento sobre la inhibición de E. coli. Esta metodología permite observar cómo la actividad bactericida del suero disminuye con la desactivación del complemento y con la dilución, lo que demuestra su papel fundamental en la defensa inmunitaria innata.

I. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- **Comprender el papel del sistema del complemento** como parte fundamental de la inmunidad innata y adaptativa en la defensa contra agentes exógenos y endógenos.

- **Analizar los mecanismos de activación del complemento**, incluyendo las rutas clásica, alterna y de las lectinas, y su importancia en la respuesta inmune.

- **Relacionar la estructura y función de las proteínas del complemento** con su regulación, variabilidad genética y consecuencias clínicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Observar experimentalmente la actividad del sistema del complemento** mediante el uso de suero humano fresco y suero inactivado frente a *Escherichia coli*.

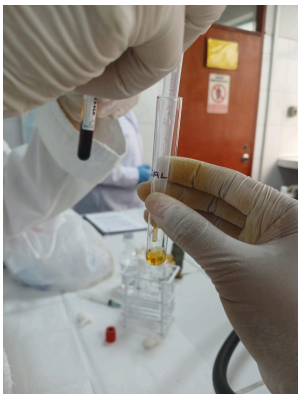
- **Demostrar la diferencia en el crecimiento bacteriano** entre medios con complemento activo e inactivo, como evidencia de la acción lítica del complemento.

II. MATERIALES

- Suero sanguíneo
- Cepa de Escherichia coli
- Placas de petri estériles
- Tubos estériles de 13 x 100
- Solución salina fisiológica esteril
- Agar Tripticasa de Soya
- Mechero de Bunsen
- Centrífuga
- Baño María
- Estufa
- Pipetas de vidrio estériles de 1 c.c y 10 c.c
- Plumón indeleble
- Visores de placas
- Gradilla

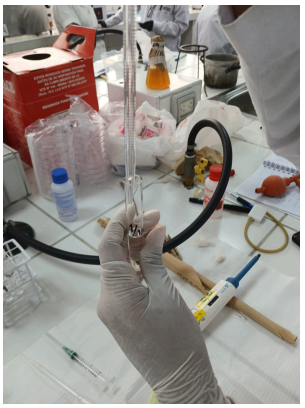
III. PROCEDIMIENTO

1. Tomar una muestra de sangre venosa con el tubo sin anticoagulante (verificar su vigencia).
2. Esperar que la sangre coagule y llevar a la centrífuga por 10 min a 3500 r.p.m
3. Completado el tiempo, decantar el suero en partes iguales en 2 tubos estériles de 13x100. Rotular un tubo como CAL (calentado) y el otro SC (sin calentar)

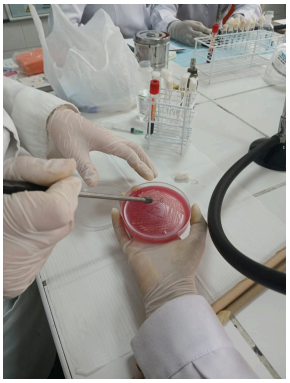


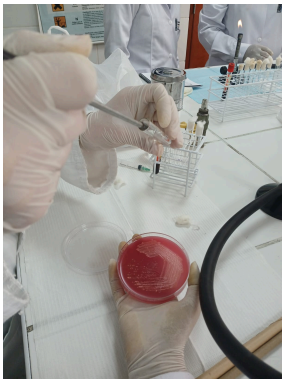
4. Luego de haber dividido el suero en los tubos estériles rotulados, se lleva al Baño Maria a 56°C por 30 min aquel que dice CAL, el otro rotulado SC lo mantenemos a temperatura ambiente.

5. Para realizar la emulsión de bacterias, se utilizó la cepa de Escherichia coli. Colocamos 5 ml de solución salina en un tubo esteril.

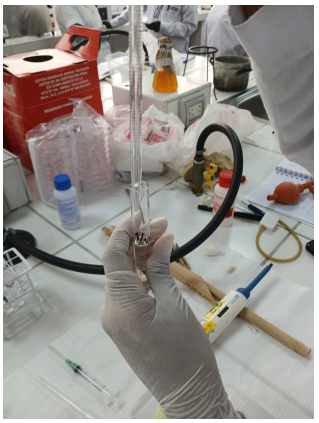


6. Luego con la ayuda del Asa de Kolle recogemos unas colonias del cultivo y emulsionamos muy bien hasta que la dilución tenga un aspecto turbio. Contiene 1’000,000 bacterias por ml.

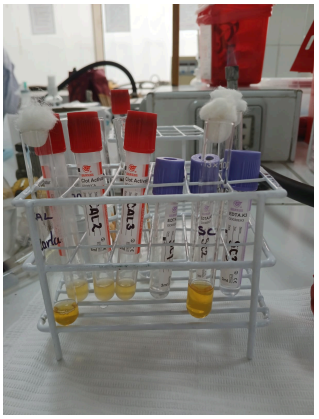




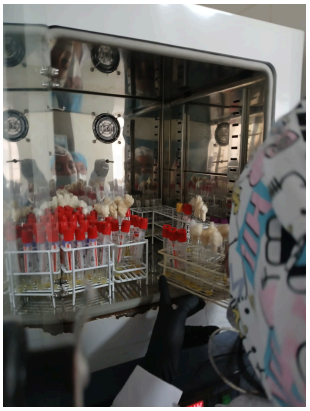
7. Posterior a ello, rotular tres tubos estériles como 1/100, 1/1000 y 1/10000, para hacer las siguientes diluciones:
   1/100: agregar 4.95 ml de solución salina estéril y 0.05 ml de la emulsión bacteriana
   1/1000: añadir 4. 5 ml de solución salina estéril y 0.5 ml de la dilución 1/100
   1/10000: agregar 4.5 ml de la solución salina estéril y 0.5 ml de la dilución 1/1000



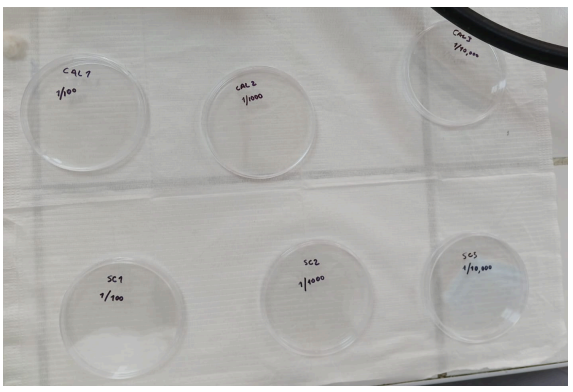
8. Tomar 3 tubos más, en este caso se usó los tubos rojos sin anticoagulante a falta de tubos. Rotulamos como CAL1, CAL2 y CAL3, que corresponden a la dilución bacteriana 1/100, 1/1000 y 1/10000 siguiendo el orden.
9. A cada uno añadir 250 microlitros de suero calentado y 250 microlitros de la dilución bacteriana que le corresponde.
10. Se realiza el mismo proceso con el suero no calentado. Vamos a rotular 3 tubos, hemos usado los tubos edta a falta de los de vidrio. Rotulamos con SC1, SC2, SC3.



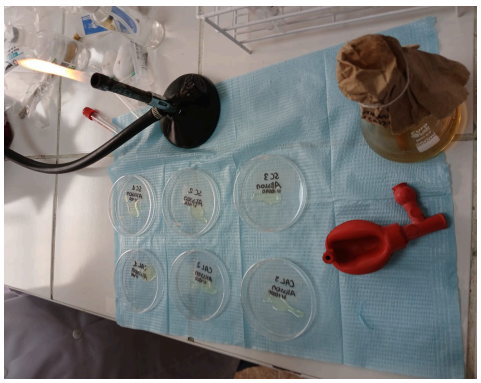
11. Luego de haber realizado todo el proceso, se llevan los 6 tubos a la incubadora a 37°C por 1 hora.



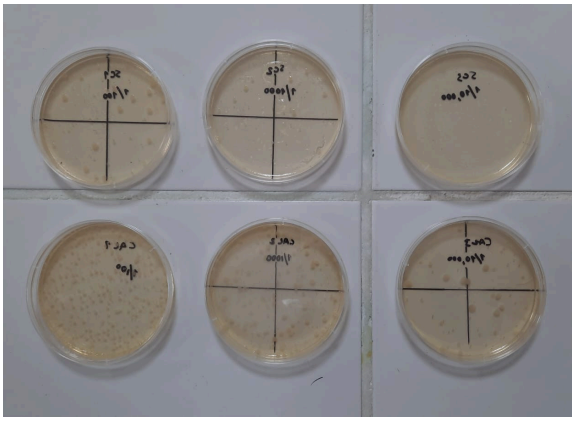
12. En el tiempo de espera, se debe ir disolviendo el medio de cultivo (Tripticasa de Soya), para ello se calienta con la ayuda del mechero, colocándolo en una olla. Se realiza un movimiento en forma circular.
13. Rotular las placas petri según como fueron rotulados los tubos anteriormente. Es decir: CAL1, CAL2, CAL3 y SC1, SC2, SC3.

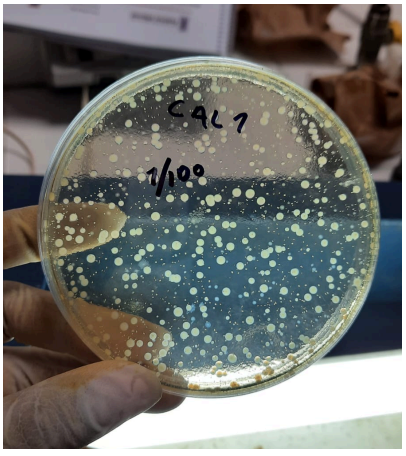


14. Después de haber cumplido el tiempo de incubación, se procede a hacer el sembrado. Se vierte el contenido de los tubos de la incubadora en cada una de las placas rotuladas según corresponda.

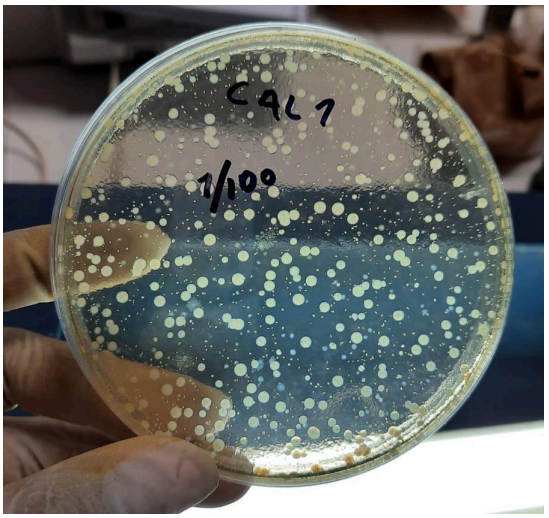


15. Añadir 9 ml del agar en cada una de ellas con la ayuda de una pipeta estéril para luego mezclar en forma rotatoria y así conseguir la distribución bacteriana ideal. Una vez solidificadas voltearlas y envolverlas con papel kraft para dirigirlas a la incubadora por 24 horas.
16. Al día siguiente, cuando ya se han cumplido las horas, verificar el crecimiento bacteriano según cada placa y proceder a realizar el recuento de las colonias haciendo uso de un visor.





IV. RESULTADOS

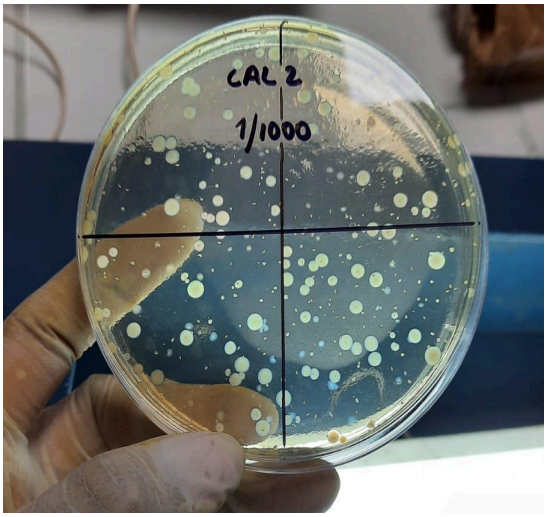


CAL 1: 1/100

n° de colonias=incontable

Podemos observar una gran cantidad de colonias, lo que evidencia una correcta expansión de la bacteria en el agar.

CAL 2: 1/1000

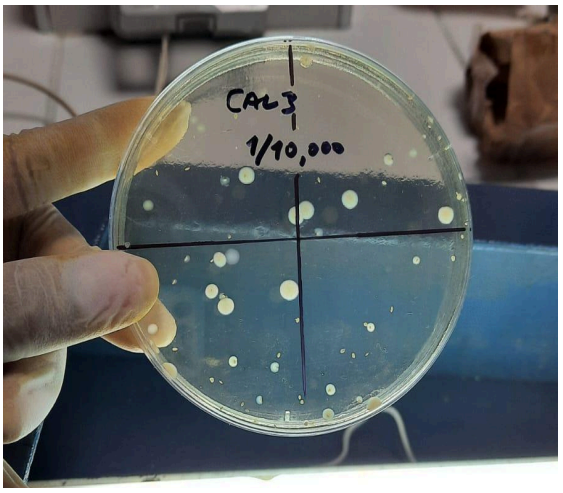


Podemos visualizar que algunas bacterias se juntaron, formando colonias, sin embargo, esto no imposibilita hacer el recuento.

n°de bacterias= 76x2=152x1000x2x10=3,040,000 UFC/ml

- Se contabilizaron 76 colonias en 2 cuadrantes lo cual es multiplicado por 2 para saber el total. Además se multiplica por 1000 debido al factor de dilución con respecto a la emulsión bacteriana 1/1000000. Luego, se duplica el resultado ya que se ha trabajado con la mitad de las muestras. Finalmente, se multiplica por 10 porque es el porcentaje de dilución.

CAL 3: 1/10,000

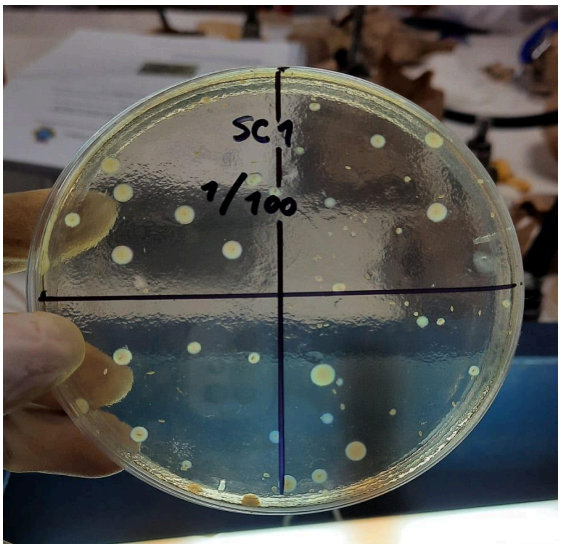


Podemos visualizar unas colonias más grandes y separadas
de igual forma podemos hacer el recuento.

n°de bacterias:27x2=54x100x2x10=108,000UFC/ml

- Se contabilizaron 27 colonias en 2 cuadrantes lo cual es multiplicado por 2 para saber el total. Además se multiplica por 100 debido al factor de dilución con respecto a la emulsión bacteriana 1/1000000. Luego, se duplica el resultado ya que se ha trabajado con la mitad de las muestras. Finalmente, se multiplica por 10 porque es el porcentaje de dilución.

SC1: 1/100

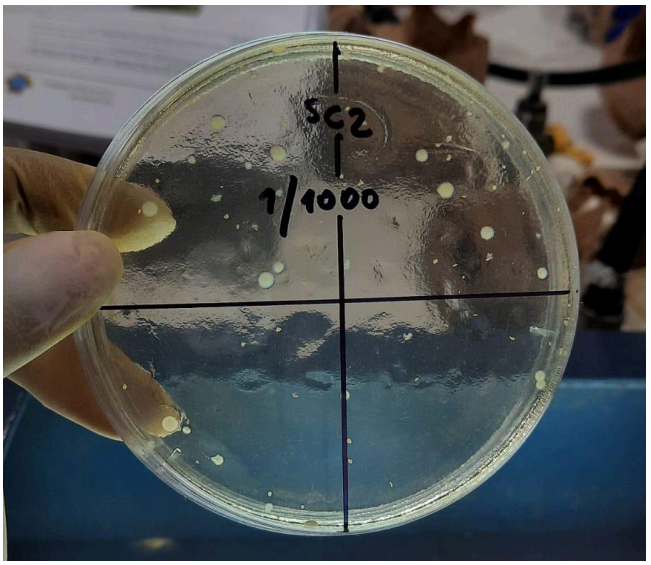


Podemos visualizar que hay colonias separadas y muy pocas,
lo que quiere decir que la acción lítica del complemento está
activa en el suero sanguíneo.

n°de bacterias=29x2=58x10,000x2x10=11,600,000 UFC/ml

- Se contabilizaron 29 colonias en 2 cuadrantes lo cual es multiplicado por 2 para saber el total. Además se multiplica por 10,000 debido al factor de dilución con respecto a la emulsión bacteriana 1/1000000. Luego, se duplica el resultado ya que se ha trabajado con la mitad de las muestras. Finalmente, se multiplica por 10 porque es el porcentaje de dilución.

SC2: 1/1000



Podemos observar que la formación de colonias es
mucho menos que SC1.

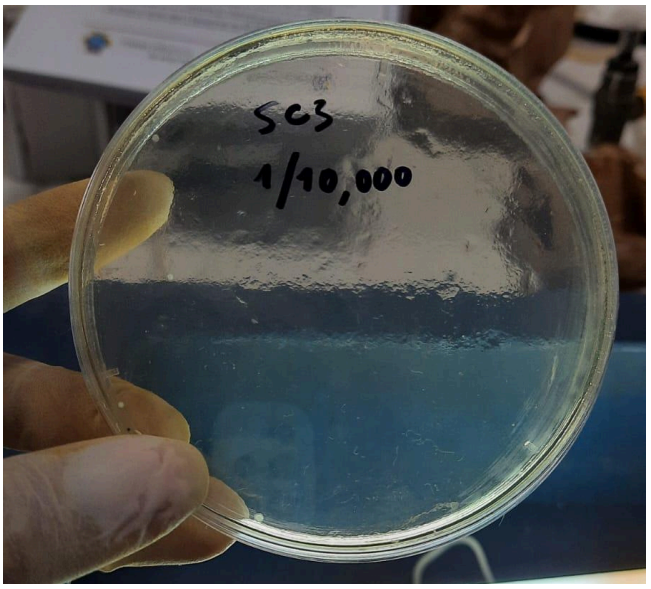
n°de bacterias: 27x2=54x1000x2x10=1,080,000 UFC/ml

- Se contabilizaron 27 colonias en 2 cuadrantes lo cual es multiplicado por 2 para saber el total. Además se multiplica por 1000 debido al factor de dilución con respecto a la emulsión bacteriana 1/1000000. Luego, se duplica el resultado ya que se ha trabajado con la mitad de las muestras. Finalmente, se multiplica por 10 porque es el porcentaje de dilución.

SC3: 1/10,000

En esta placa hay nulo desarrollo de colonias, por lo que queda verificado que la acción lítica del
complemento fue desarrollada por completo, con ayuda
del porcentaje de dilución.

n°de colonias: nula



V. CONCLUSIÓN

La práctica realizada permite demostrar experimentalmente la importancia funcional del complemento, al comparar el efecto del suero humano fresco (con complemento activo) y del suero inactivado térmicamente sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. La diferencia observada en el desarrollo bacteriano evidencia la capacidad lítica del sistema del complemento y su papel crucial en la defensa inmunitaria. Esta experiencia práctica, además de ilustrar un proceso complejo de manera tangible, refuerza la comprensión de los mecanismos moleculares que sustentan la inmunidad y su aplicación clínica.

RESOLUCIÓN DEL CUESTIONARIO

1. **¿Qué diferencia esperas observar entre el desarrollo bacteriano de las bacterias incubadas con el suero calentado y el suero sin calentar?**

Se espera que las bacterias crezcan más en el suero que fue calentado, conforme su factor de dilución. En el caso de 1/100 están deben crecer en mayor cantidad, en las demás diluciones también debe haber crecimiento pero será menor al primero debido a su factor. Por otro lado, en el suero sin calentar debe haber crecimiento casi nulo de bacterias, en cada dilución se deben observar cada vez menos cantidad.

2. **¿Por qué se da esta diferencia?**

   El suero sin calentar conserva activo el sistema del complemento, un conjunto de proteínas que actúan eliminando bacterias, por lo que inhibe su crecimiento. En cambio, al calentar el suero (a 56 °C por 30 minutos), estas proteínas se desactivan, perdiendo su función bactericida, lo que permite que las bacterias, como *E. coli*, crezcan con mayor libertad.

RESPUESTA AL INFORME: PODER BACTERICIDA DEL SUERO: Para: Zabarburu Fernández y Sairitupa Miranda: 1.- Paso 9 : ¿Uds. lo hicieron como mencionan? entonces el total del volumen en cada tubo fue de : 500 uL ¡¡¡OJO¡¡¡¡. 2.- Paso 15: Si Uds. trabajaron como dicen en el paso 9, es incorrecto lo que han realizado en este paso (15) ; deberían de haber añadido 9.5 ml de agar ala placa. ¡¡Por favor revisen diluciones¡¡ por eso sus resultados finales en las placas no corresponde a lo esperado.